



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) (21) **PI 0303510-7 A**



(22) Data de Depósito: 15/09/2003
(43) Data de Publicação: 10/05/2005
(RPI 1792)

(51) Int. Cl.⁷.:
A61K 39/39
A61P 37/04

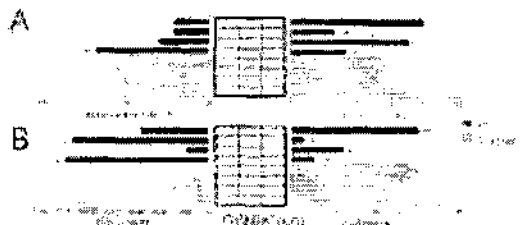
(54) Título: **COMPOSIÇÕES IMUNOGÊNICAS E MÉTODO PARA ESTIMULAR UMA RESPOSTA IMUNE**

(71) Depositante(s): Universidade Federal do Rio de Janeiro (BR/RJ)

(72) Inventor(es): Julio Scharfstein, João Paulo de Biaso Viola

(74) Procurador: Bhering, Almeida & Associados

(57) Resumo: "COMPOSIÇÕES IMUNOGÊNICAS E MÉTODO PARA ESTIMULAR UMA RESPOSTA IMUNE". A presente invenção está relacionada a composições imunogênicas que contêm cininas sintéticas capazes de exercer efeito adjuvante em formulações vacinais, pelo fato de ligarem-se a receptores de cininas expressos por células apresentadoras de antígenos, estimulando a produção de interleucina 12 (IL-12) e moléculas co-estimulatórias, e direcionando a resposta para um padrão Th1, em animais de sangue quente.



COMPOSIÇÕES IMUNOGÊNICAS E MÉTODO PARA ESTIMULAR

UMA RESPOSTA IMUNE

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção está relacionada a composições
5 imunogênicas que permitem estimular uma resposta imune
devido à presença de cininas sintéticas com ação adjuvante,
capazes de estimular a produção de altos níveis de
interleucina 12 (IL-12) e moléculas co-estimulatórias em
células apresentadoras de antígenos, mediante ativação de
10 receptores de cininas, direcionando a resposta imune para
um padrão Th1, em animais de sangue quente.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Células dendríticas têm grande importância na indução
da resposta imune inata e adquirida contra infecções
15 causadas por diferentes patógenos.

Ao exercerem o papel de sentinelas, as células
dendríticas respondem a sinais endógenos de ativação,
liberados em um tecido injuriado mesmo na ausência de um
agente infeccioso.

20 As cininas são potentes peptídeos bioativos, compostos
de 8 a 10 aminoácidos, estruturalmente relacionados à
bradicinina, capazes de produzir sintomas clássicos da
inflamação, incluindo febre, vermelhidão, edema e
hiperalgesia. Além de seus efeitos na inflamação, as
25 cininas e seus receptores participam na homeostase

microvascular, controlando o calibre de vasos por meio da produção de óxido nítrico (NO) pelo endotélio, e contribuem para o reparo de lesões tissulares. A ativação do sistema cinina, em geral, depende do processamento dos precursores

5 protéicos de cininas (os cininogênios de alto e/ou baixo peso molecular, HK e LK), pelas calicreínas plasmática e tissular, respectivamente. Enquanto o HK é o substrato preferido para a calicreína plasmática, liberando o nonapeptídeo bradicinina, a calicreína tissular atua tanto

10 sobre LK quanto HK, em ambos os casos liberando lisil-bradicinina (calidina) (Bhoola KD, Figueroa CD and Worthy K. 1992. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol. Rev.* 44:1-80).

A ação da calicreína tissular (TK) requer a conversão

15 de seus precursores intracelulares por enzimas cujo estado da arte carece de uma melhor caracterização. A calicreína tissular tem sua ação restrita ao interstício, agindo tanto sobre LK ou HK. Dois principais mecanismos têm sido propostos para explicar a liberação de cinina pela

20 calicreína plasmática. O mecanismo clássico envolve 3 principais componentes associados à ativação da via intrínseca de coagulação: fator XII (fator de Hageman), plasma pré-calicreína (PK) e o HK. A exposição do sangue a superfícies sub-endoteliais ("fase de contato") seguido

25 pela perda da barreira endotelial, ou secreção de proteases

de neutrófilos granulócitos que aderem ao endotélio, inicia a conversão de pequenas quantidades de fator XII na forma ativa, fator XIIa. Este ativa a PPK em calicreína plasmática (PK), que aumenta a conversão do fator XII. A
5 calicreína rapidamente cliva o HK ao qual está associada, resultando na liberação de bradicinina na proximidade do seu receptor.

Estudos anteriores evidenciaram que a deficiência das proteínas desse sistema não causa eventos hemorrágicos,
10 indicando um papel fisiológico fora do sistema hemostático, por exemplo, na manutenção da integridade das veias e da pressão sanguínea, da fibrinólise e dos níveis de atividade anticoagulante do compartimento intravascular (Rojkjaer R, Schmaier AH. 1999. Action of plasma kallikrein/kinin system
15 on endothelial cell membranes. *Immunopharmacology* 43: 109-114). O segundo mecanismo de ativação do sistema cinina-calicreína postula que a interação do HK-PPK com seus receptores na superfície da célula endotelial é uma etapa chave na ativação de PK. O receptor multiprotéico
20 compreende a citoqueratina (CK1), receptor de uroquinase e plasminogênio (uPAR), e o receptor de Clq (gClqR) (Schmaier AH. 2002. The plasma kallikrein-kinin system counterbalances the renin-angiotensin system. *J Clin Invest.* 109:1007-1009). Quando o complexo HK/PPK se liga na
25 superfície da célula endotelial, a PPK é rapidamente

convertida em calicreína pela enzima prolylcarboxipeptidase. Essa enzima é uma serino protease lisossomal com ação de angiotensinase, que está constitutivamente ativa na membrana da célula endotelial

5 (Shariat-Madar Z, Madhi F, Schmaier AH. 2002. Identification and characterization of prolylcarboxypeptidase as an endothelial cell prekallikrein activator. *J Biol Chem.* 277:17962-9). A calicreína então cliva o HK, liberando cinina, além de ativar FXII, que está

10 ligado a esse mesmo complexo multireceptor, juntamente com HK (Mahdi F, Madar ZS, Figueroa CD, Schmaier AH. 2002. Factor XII interacts with the multiprotein assembly of urokinase plasminogen activator receptor, α ClqR, and cytokeratin 1 on endothelial cell membranes. *Blood* 99:3585-

15 96).

Receptores de Cininas

Os efeitos biológicos das cininas são mediados por dois subtipos de receptores acoplados a proteínas G regulatória, B_2 e B_1 . Os receptores B_2 são constitutivamente

20 expressos na superfície de células endoteliais, músculo liso e, em menor concentração, em células epiteliais, fibroblastos e neurônios. Em contraste, o receptor B_1 tem uma baixa expressão em tecidos normais, mas tem sua expressão aumentada sob condições fisiopatológicas como

25 injúria, infecção ou inflamação crônica, que apresentam

propriedades farmacológicas distintas. A especificidade farmacológica destes 2 receptores é distinta. Os agonistas do receptor constitutivo B_2 são BK e lisil-BK ("calidina"), respectivamente gerados pela ação das calicreínas plasmática e tissular sobre os cininogênios. A ativação de receptores B_1 em resposta a DABK induz alguns dos efeitos mediados pelos receptores B_2 , além de diversas outras relacionadas com a manutenção da resposta inflamatória (McLean P, Ahluwalia A and Perretti, A. 2001. Association between kinin B_1 receptor expression and leukocyte trafficking across mesenteric postcapillary venules. *J Exp Med.* 192:367-80). Acredita-se que os receptores B_1 podem amplificar os efeitos dos receptores B_2 na sepsis e/ou inflamação crônica (Marceau, F. 1995. Kinin B_1 receptors: a review. *Immunopharmacology* 30:1-26).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Na presente invenção são descritas composições capazes de estimular células dendríticas de maneira específica para produção de altos níveis de interleucina 12 (IL-12), uma citocina de grande relevância na proteção contra infecções. Esta produção é mediada por receptores de bradicinina e induz um padrão de resposta Th1.

O estado da arte não descreve cininas como mediadores capazes de ativar o sistema imune inato através de

interação com receptores de bradicinina expressos em células apresentadoras de antígenos.

A presente invenção descreve uma composição imunogênica, suplementada de cininas ou agonistas estruturalmente relacionados com cininas, capazes de interagir de maneira específica com receptores de bradicinina, presentes nestas células apresentadoras de antígenos, notadamente em células dendríticas, levando à produção de interleucina 12, uma citocina que estimula a resposta imune inata, favorecendo a diferenciação de linfócitos Th1.

A ativação de células dendríticas por patógenos constitui o elo entre resposta imune inata e adquirida, uma vez que a mesma população de células que ativa a resposta inata para a produção de citocinas pro-inflamatórias também ativam células T efectoras, responsáveis pela eliminação de diversos patógenos. O aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e o aumento da expressão de moléculas de superfície como CD40, CD80, CD86 e moléculas de classe II nas células apresentadoras de antígeno, é reflexo do reconhecimento de sinais de perigo emitidos por produtos microbianos que ativam membros de uma família de sete receptores heterodiméricos transmembranares acoplados a proteína G, como o receptor formil-peptídeo para bactérias e o receptor de C-C quimiocina (CCR) 5 para protozoários.

De maneira similar, as cininas liberadas em tecidos inflamados representam sinais de perigo de origem endógena, e exercem sua função agonista mediante ligação a dois subtipo de receptores heterodiméricos acoplados a proteína G receptores, B₁ ou B₂, com propriedades farmacológicas distintas. A meia vida das cininas é curta, devido ao processamento proteolítico por diversas cininases, presentes no plasma e no compartimento extravascular. Assim, circunstâncias que favorecem o acúmulo de cininas nos tecidos inflamados propiciam a ativação de receptores de cininas expressos em diversos tipos celulares, inclusive em células dendríticas, promovendo sua maturação e por conseguinte, estimulando a imunidade inata.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A fim de facilitar uma compreensão mais detalhada da natureza da invenção, são apresentadas as Figuras, onde:

A **Figura 1** mostra a ativação de células dendríticas por lisil-bradicinina após sua administração intraperitoneal aumentando a produção de IL-12 plasmática que é dependente da concentração plasmática de lisil-bradicinina;

A **Figura 2** mostra que a produção de IL-12 é mediada por receptores B₂, uma vez que camundongos deficientes destes receptores não foram capazes de induzir níveis significativos de IL-12;

A **Figura 3** mostra que a adição de versão sintética de cinina (lisil-bradiginina ou bradiginina) às emulsões que contenham um imunógeno modelo (i.e., Ovalbumina) provoca a polarização da resposta Th2 em Th1, através de uma via de
5 ativação IL-12 dependente.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS MODALIDADES PREFERIDAS

A invenção será agora ilustrada em maiores detalhes no que se refere aos seguintes exemplos, porém deve-se entender que a presente invenção não deve ser considerada
10 como aqui restrita aos mesmos.

EXEMPLOS

Na presente invenção foram desenvolvidas composições imunogênicas capazes de ativar células dendríticas cuja indução é mediada por receptores de bradiginina e podem ser
15 melhor caracterizadas pelos exemplos a seguir. Para melhor caracterizar os exemplos descritos abaixo, as Figuras de 1 a 3 ilustram os resultados obtidos na indução da resposta imune.

Exemplo 1 - Mobilização e indução de células dendríticas
20 esplênicas in vivo por cininas:

Os animais utilizados foram camundongos de 5 a 6 semanas de idade. Para estudos utilizando células dendríticas de baço, células esplênicas foram digeridas com Liberase CI (Roche Biochemicals, Indianapolis, IN) e a
25 suspensão de células obtida foi centrifugada em gradiente

de soroalbumina bovina (Sigma) e as células de baixa densidade foram coletadas, lavadas por centrifugação e ressuspensas em meio RPMI complementado com 10% de soro bovino fetal inativado. Para avaliar se as cininas podem
5 estimular a resposta imune inata, camundongos $B_2R^{+/+}$ e $B_2R^{-/-}$ receberam injeção de lisil-bradicinina e em seguida, foram determinados os níveis de IL-12p70. A determinação dos níveis de citocina foi realizada por ELISA. A injeção de lisil-bradicinina induziu o aumento de IL-12p70 $B_2R^{-/-}$
10 dependente in vivo. A resposta que induz a produção de IL-12 é rápida alcançando o pico uma hora após administração. Quando administrada em presença de captopril, um inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), a duração da resposta caracterizada pela produção de IL-12 é
15 significativamente aumentada, sugerindo um aumento do tempo de meia vida plasmática de lisil-bradicinina (Figura 1A). A fim de avaliar se a indução da produção de IL-12 está relacionada à administração de cininas, camundongos foram injetados com carragenina, um conhecido estimulador do
20 sistema de cininas. Após injeção de carragenina, foi observada uma produção significativa de IL-12 e IL-10 ex vivo, e promoção da migração de células dendríticas $CD11c^+$, conforme revelaram os estudos de citometria de fluxo demonstrado na Figura 1B. Estes resultados corroboram com o

aumento dos níveis de CD40, CD80 e CD86 após administração de carragenina ou de lisil-bradicinina.

Exemplo 2 - Indução de células dendríticas in vitro por cininas:

5 A fim de avaliar o papel das cininas na ativação de células dendríticas, células esplênicas CD11c⁺ foram isoladas e incubadas com diferentes concentrações de lisil-bradicinina (0,01 a 10 μ M). As análises do sobrenadantes das culturas indicam que a adição de lisil-bradicinina
10 estimula a produção de IL-12p40 pelas células esplênicas. Esta produção de IL-12p40 é dependente da ativação de receptores B₂ uma vez que células deficientes destes receptores, obtidas a partir de camundongos B₂R^{-/-}, não responderam para a produção desta citocina (Figura 2A),
15 enquanto respondem normalmente a estímulos de endotoxinas (LPS) ou CpGs. A Figura 2A mostra ainda que, em presença de agonistas de receptores B₁ como a Des-Arg-BK, não há indução de níveis detectáveis de IL-12p40. Estes dados sugerem que células dendríticas produzem IL-12 em resposta
20 à ativação de sinais mediados por cininas por meio de receptores constitutivos B₂. A fim de analisar as consequências funcionais de ativação de células dendríticas mediada por cininas foram analisados os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 em culturas estimuladas com lisil-
25 bradicinina ou com Des-Arg-BK agonista de B₁R. De maneira

similar à indução de IL-12 dependente de receptores B_2 , a produção de IL-10 por células dendríticas foi aumentada em resposta a lisil-bradicinina mas não por Dêl-Arg-BK (Figura 2B). Na ausência de lisil-bradicinina exógena, a adição de

5 inibidor da ECA em células dendríticas selvagens resultaram em níveis mais elevados de IL-10 e baixos níveis de IL-12. No mesmo tipo de cultura o captopril sozinho não estimula a produção de IL-10 por células dendríticas de camundongos $B_2R^{-/-}$. Estes resultados sugerem que na presença de inibidor

10 da ECA, as células dendríticas selvagens produzem preferencialmente IL-10 em resposta a baixos níveis de cininas endógenas liberadas em cultura. Consistentemente, a estimulação de camundongos IL-10 $^{-/-}$ com lisil-bradicinina in vitro e in vivo induziu maior produção de IL-12 quando

15 comparado com camundongo selvagem sugerindo que a IL-10 opõe-se a atividade inflamatória de bradicinina regulando negativamente a produção de IL-12 (Figura 2D). Utilizando antagonistas específicos de receptores B_1 e B_2 , foi confirmado o envolvimento direto de receptores B_2 na

20 produção de IL-12 por células dendríticas induzidas por lisil-bradicinina (Figura 2E). Estudos de citometria de fluxo em subpopulações de células dendríticas revelaram que células dendríticas $CD11c^+$, $CD8\alpha^+$, $CD4^-(CD8)$ e $CD11c^+$, $CD8\alpha^-$, $CD4^-(DN)$ mas não células $CD11c^+$, $CD8\alpha^-$, $CD4^+(CD4)$

25 respondem a lisil-bradicinina como determinado pelas

freqüências significativamente maiores de célula produtora de IL-12 após estimulação com lisil-bradicinina. Além disso, outras moléculas co-estimulatórias como CD40, CD80 e CD 86 assim como MHC de classe II são positivamente reguladas em células dendríticas ativadas por cininas (Figura 2F). Como esperado dos dados funcionais, 20% das células dendríticas esplências CD11c⁺ expressam altos níveis de receptores B₂ (Figura 2G).

Exemplo 3 - Indução in vivo da ativação de células Th1 para um antígeno OVA, de forma IL-12 dependente, por lisil-bradicinina previne a infiltração eosinofílica em um modelo de pleurite.

Um modelo de pleurite Th2 dependente foi utilizado para avaliar se a atividade adjuvante de lisil-bradicinina pode prevenir a indução de respostas predominantemente Th2, que neste modelo é caracterizada pela secreção de altos níveis de IL-4 e baixos níveis de interferon-gama (Figura 3B). Camundongos foram imunizados com emulsões de ovalbumina (OVA) e alum contendo quantidades fixas de lisil-bradicinina sintética. Quando desafiados com o antígeno OVA na ausência de Lisil-bradicinina um infiltrado rico em eosinófilos foi observado na cavidade pleural (Figura 3A). Um infiltrado de eosinófilos reduzido foi observado em camundongos imunizados com emulsões baseadas em alum contendo a mistura de lisil-bradicinina e o

antígeno OVA (Figura 3A - painel direito). Consistente com estes achados, animais imunizados com a mistura de OVA e lisil-bradicinina mostraram uma redução dos níveis de IL-4 OVA-específicos, sendo esta resposta acompanhada por um
5 aumento dos níveis de interferon-gama (Figura 3B). O pré-tratamento com captopril ou o peptídeo lisil-bradicinina sozinho (sem OVA) não tem efeito sobre o nível basal de respostas específicas para OVA. Animais pré-tratados com captopril e imunizados com OVA sozinha falharam em inibir a
10 infiltração eosinofília pleural e apresentaram um direcionamento mínimo de resposta Th1. Entretanto a combinação de OVA e lisil-bradicinina em animais tratados com captopril otimizou a atividade Th1 do peptídeo lisil-bradicinina induzindo altos níveis da produção de
15 interferon-gama OVA-específica por células T, bem como aumentando o número de células mononucleares. As observações acima demonstram que: (i) a administração sistêmica de lisil-bradicinina ou bradicinina podem ativar células dendríticas por meio de receptores B₂ a produzirem
20 IL-12 in vivo, mesmo que em baixos níveis; (ii) imunização com antígeno em um microambiente rico em lisil-bradicinina favorece a estimulação de resposta Th1.

Exemplo 4 - Influência de lisil-bradicinina no mecanismo de ativação de células T virgens por OVA:

Para avaliar o mecanismo pelo qual lisil-bradicinina afeta a estimulação de células T virgens por OVA, animais IL-12p40^{-/-} foram submetidos aos mesmos protocolos de imunização anteriores. Este experimento mostrou que na
5 ausência de lisil-bradicinina camundongos IL-12p40^{-/-} imunizados com OVA foram subseqüentemente desafiados por injeção do antígeno na cavidade pleural desenvolvendo uma intensa infiltração eosinofílica e produção significativa de IL-4 (Figura 3A e B - painel direito). Em animais que
10 são incapazes de produzir IL-12p40, a administração de bradicinina junto com o imunógeno OVA, com ou sem captopril, falhou em induzir resposta do tipo Th1 como previamente descrito em camundongo selvagem. Além disto, os animais IL-12p40^{-/-} que receberam lisil-bradicinina
15 apresentaram pronunciada infiltração eosinofílica na cavidade pleural sugerindo que o principal mecanismo pelo qual bradicinina reduz a infiltração eosinofílica é pela indução de IL-12 por células apresentadoras de antígeno, que por sua vez, dão suporte ao desenvolvimento in vivo de
20 células T, antígeno- específica, produtora de interferon-gama.

Embora a invenção tenha sido descrita detalhadamente e se refira a exemplos específicos desta, ficará evidente aquele que for perito neste conhecimento que várias

alterações e modificações podem ser realizadas sem se afastar do espírito nem do objetivo da presente invenção.

REINVIDICAÇÕES

1. Composição imunogênica caracterizada por conter um antígeno e cininas, capaz de estimular células apresentadoras de antígenos a produzir interleucina-12 e
5 aumentar a expressão de moléculas co-estimulatórias, direcionando uma resposta de padrão Th1 em animais de sangue quente.

2. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1 caracterizada pela composição conter uma
10 cinina capaz de estimular receptores B2 de células apresentadoras de antígeno.

3. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1 caracterizada pelo fato da cinina ser a bradiginina.

15 4. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1 caracterizada pelo fato da cinina ser a lisil-bradiginina.

5. Composição farmacêutica caracterizada por conter um antígeno e uma cinina sintética veiculada em uma forma
20 farmacêutica adequada e compatível com seu emprego na vacinação de animais de sangue quente.

6. Método capaz de induzir uma resposta imune caracterizado pelo fato de que as cininas contidas nas formulações vacinais estimulam a produção de interleucina
25 12.

7. Método capaz de induzir uma resposta imune caracterizado pelo fato de que as cininas contidas nas formulações vacinais estimulam a produção de moléculas co-estimulatórias como CD40, CD80, CD86 e MHC classe II em
5 células apresentadoras de antígeno.

8. Método capaz de induzir uma resposta imune caracterizado pelo fato de que as cininas contidas nas formulações vacinais estimulam uma resposta de padrão Th1 específica para os antígenos de escolha.

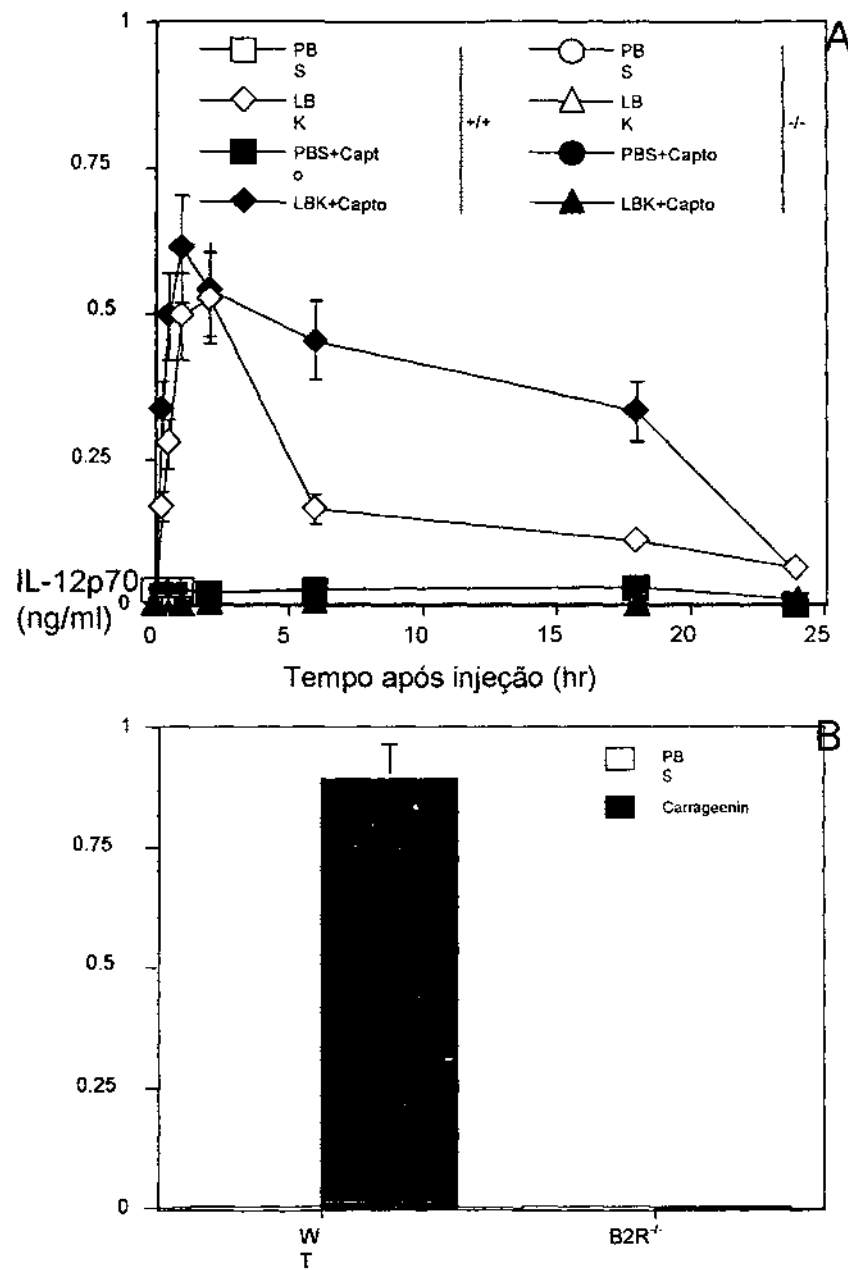
10 9. Método capaz de induzir uma resposta imune caracterizado pelo fato de que a intensidade e duração do efeito imunoestimulante mediado por cininas pode ser aumentada pela administração de inibidores da ECA.

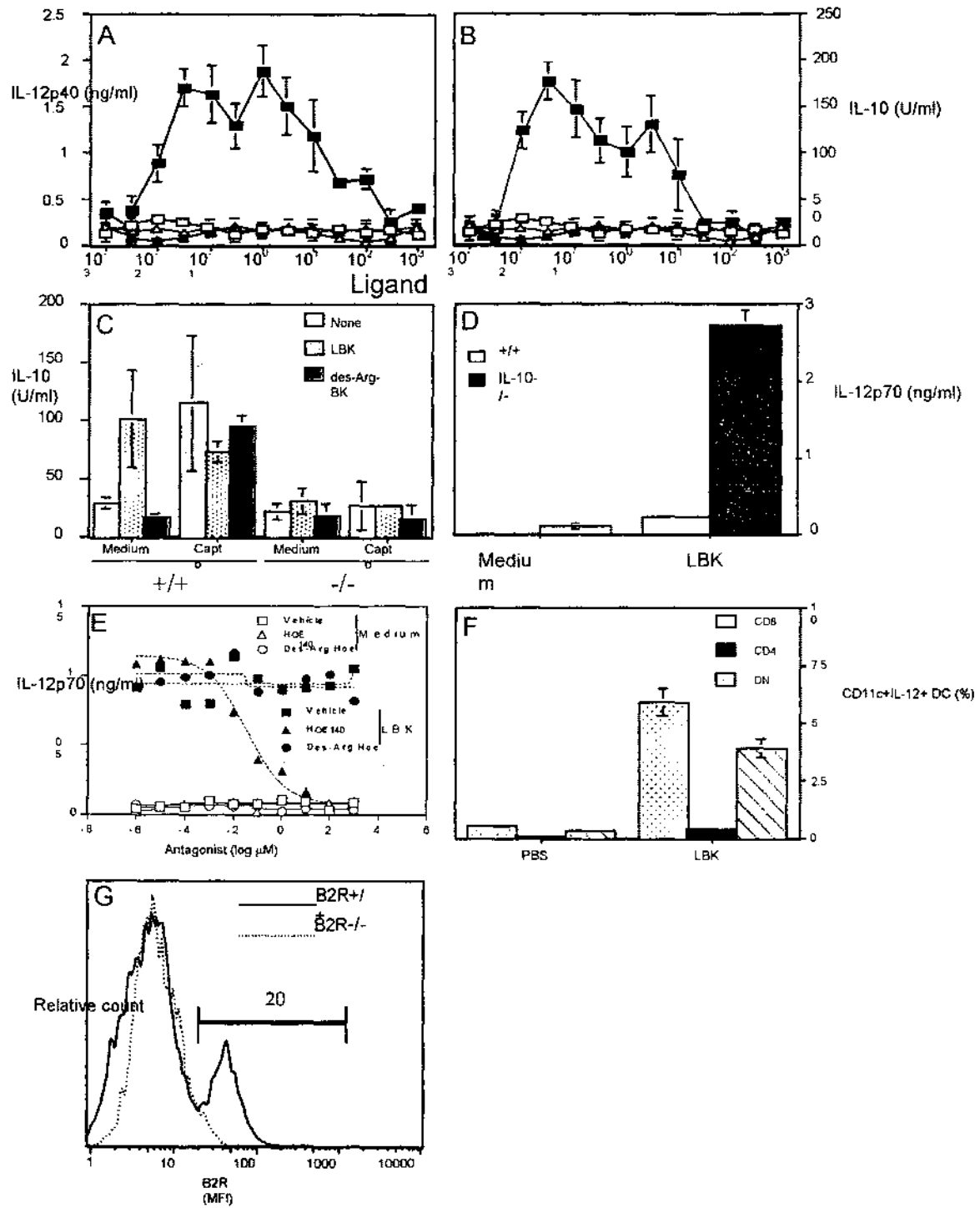
15 10. Método de acordo com a reivindicação 9 caracterizado pelo fato de que o inibidor de ECA é o captopril.

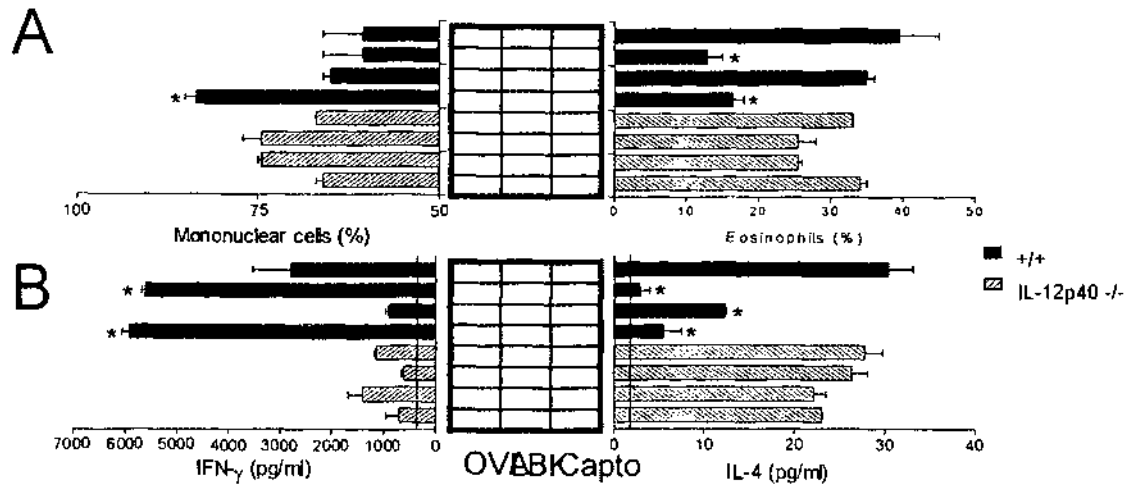
11. Uso da bradicinina ou da calidina sintética como adjuvante imunológico.

20 12. Uso de cininas associadas com inibidores de ECA como adjuvante imunológico.

13. Uso de análogos de cininas caracterizados pelo fato de serem resistentes a ação de cinininasases, como adjuvante imunológico.







RESUMO**COMPOSIÇÕES IMUNOGÊNICAS E MÉTODO PARA ESTIMULAR****UMA RESPOSTA IMUNE**

A presente invenção está relacionada a composições
5 imunogênicas que contêm cininas sintéticas capazes de
exercer efeito adjuvante em formulações vacinais, pelo
fato de ligarem-se a receptores de cininas expressos por
células apresentadoras de antígenos, estimulando a produção
de interleucina 12 (IL-12) e moléculas co-estimulatórias, e
10 direcionando a resposta para um padrão Th1, em animais de
sangue quente.